Plaques de typage HLA

Mode d'emploi

Pour usage diagnostique in vitro

1 Introduction :

Les plaques de typage HLA Invitrogen™ permettent d'identifier et de définir les antigènes d'histocompatibilité et sont utilisées pour le typage HLA.

L'analyse de microlymphocytotoxicité utilise des lymphocytes comme cible. Il est facile d'extraire des cellules viables du sang périphérique, des ganglions lymphatiques, de la rate, etc. Cette analyse sérologique évalue la mort cellulaire en activant le complément de lapin en présence de combinaisons antigènes-anticorps. La réaction antigène-anticorpscomplément dépendant est évaluée en visualisant le test au microscope, amplifié 150 x, avec éclairage par contraste de phase et une coloration vitale telle que l'éosine Y ou l'iodure de propidium. Les cellules mortes (qui possèdent l'antigène détecté par les antisérums spécifiques) absorberont le colorant et manifesteront un changement de couleur approprié. Les cellules négatives (celles où manque l'antigène détecté par les antisérums spécifiques) restent viables et excluent le colorant.

Les plaques de typage HLA Invitrogen™ sont utilisés dans les analyses de microlymphocytotoxicité afin de définir les antigènes HLA. Les antisérums monospécifiques et multispécifiques du point de vue opérationnel pour les antigènes HLA sont inclus. Des témoins positifs et négatifs sont compris dans le sachet deplaques.

MISE EN GARDE : MANIPULER COMME POUVANT TRANSMETTRE DES MALADIES INFECTIEUSES
Le plasma et/ou le sérum à partir duquel ce produit a été dérivé a été testé par une méthode d'analyse approuvée par la FDA et les résultats obtenus étaient négatifs en ce qui concerne l'antigène HBs, le VIH-1 et le VHC. Toutefois, aucune méthode de test n'offre une garantie absolue que le VIH, le virus de l'hépatite B ou d'autres agents d'infection sont absents. Ils doivent donc être manipulés comme étant des prélèvements de sang humain pouvant être infectieux.

2 Composants du kit :

2.1 Des plaques de 72 puits contenant 1 µl/puits d'antisérum contenant de l'azide de sodium à 0,1 % comme agent de conservation et du rouge de phénol comme indicateur de pH, couverts d'une couche de 4 à 5 µl d'huile minérale. Conserver à – 55 °C ou en dessous dans un CONGÉLATEUR N'ELIMINANT PAS LE GIVRE.

2.2 Complément de lapin, 3 ml vial(s), Conserver à – 55 °C ou en dessous dans un CONGÉLATEUR N'ELIMINANT PAS LE GIVRE

2.3 Fiche de travail/Certificat d'analyse

3 Matériaux, réactifs et équipement non fournis :

3.1 Centrifugeuse de paillasse

3.2 Microscope optique

3.3 Microscope à contraste de phase ou à fluorescence inversé

3.4 Pipettes Pasteur de 15 et 23 cm

3.5 Seringues à microtitrage de 50 µl, 100 µl, 250 µl

3.6 Éprouvettes de 12 x 75 mm et 17 x 100 mm

3.7 Hémocytomètre

3.8 Lame protectrice en verre 5 x 7,5 cm

3.9 Billes magnétiques, Préparation des cellules HLA de classe Ipar les Dynabeads® de Invitrogen™ (code de produit 21902-USA, 21002D-Tous autres) et Préparation des cellules HLA de classe Iipar les Dynabeads® de Invitrogen™ (code de produit 21903-USA, 21003-Tous autres)

3.10 Dextran à 5 %

3.11 Solution Ficoll-Hypaque

3.12 Milieu RPMI-1640 avec ajout de tampon HEPES et de Pen/Strep

3.13 Liquide de Hanks

3.14 Bleu trypan

3.15 Solution d'éosine Y ou CFDA

3.16 Formol neutralisé, 12 à 37 %, pH 7,0 ± 0,2, ou iodure de propidium dans une solution de refroidissement

3.17 Sérum humain en lots (PHS), code de produit Invitrogen™ 34005100

4 Critères pour échantillons :

4.1 Une suspension lymphocytaire est préparée à partir de 10 ml de sang total prélevé dans un tube vacutainer contenant une solution ACD ou de citrate de sodium ou d'héparine. La concentration des cellules est ajustée à 2 à 3 x 10^6 cellules/ml. La suspension lymphocytaire doit être préparée dans les 48 heures suivant le prélèvement de sang total pour obtenir une viabilité optimale. La suspension doit être conservée à température ambiante jusqu'à utilisation.

4.2 Une viabilité de plus de 80 % sans contamination excessive des cellules non lymphocytaires est essentielle pour obtenir une performance optimale des sérums de typage leucocytaire.

4.3 Une contamination granulocytaire ou un bruit de fond de lymphocytes non viables élevé pourrait entraîner une réaction faussement positive.

4.4 Une contamination plaquettaire peut donner lieu à une action lytique incomplète des lymphocytes entraînant une réaction faussement négative.

4.5 Les lymphocytes peuvent être préparés selon la procédure suivante ou d'autres méthodes proposées dans le manuel des procédures de laboratoire ASHI.

5 Préparation de la suspension lymphocytaire :

5.1 Prélever 10 ml de sang complet dans un tube vacutainer contenant une solution ACD ou citrate de sodiumou de l'héparine. (L'EDTA s'est trouvé être un anticoagulant non acceptable.) Conserver l'échantillon à température ambiante jusqu'à l'utilisation.

5.2 Centrifuger le sang pendant 10 minutes à 700-900 x g afin d'obtenir une couche leuco-plaquettaire.

5.2.1 Ceci peut également être effectué en utilisant un agrégant tel que le dextran à 5 % comme suit :

5.2.1.1 Mélanger 2 ml de dextran à 5 % avec 10 ml de sang total et laisser les globules rouges se déposer à 37 °C pendant 15 minutes.

5.3 À l'aide d'une pipette Pasteur, retirer la couche leuco-plaquettaire (environ 2 ml) avec soin et la transférer dans un tube propre de 17 x 100 mm contenant 5 m de liquide de Hanks. Bien mélanger.

5.4 Verser 4 ml de solution de gradient Ficoll-Hypaque (FH) (22 °C) dans un tube propre de 17 x 100 mm. Disposer avec soin la suspension de la couche leuco-plaquettaire sur la solution de gradient FH.

5.5 Centrifuger pendant 20 minutes à 700 x g. Suivant la centrifugation, les cellules mononucléaires peuvent être trouvées sous forme d'une bande étroite à l'interface entre le plasma/diluant et la solution de gradient.

5.6 Aspirer la totalité de la couche de cellules mononucléaires et la transférer dans un tube de 17 x 100 mm. Diluer avec 4 ml de liquide de Hanks.

5.7 Centrifuger pendant 10 minutes à 600 x g. Retirer le surnageant, suspendre à nouveau soigneusement le sédiment cellulaire, ajouter 4 m de liquide de Hanks et centrifuger pendant 10 minutes à 600 x g.

5.8 Retirer le surnageant et suspendre à nouveau le sédiment cellulaire dans 1 ml de RPMI-1640 contenant du PHS à 20 %.

5.9 Examiner la suspension cellulaire sur un hémocytomètre. Évaluer la pureté et effectuer une numération cellulaire. Ajouter la concentration cellulaire à 2 à 3 x 10^6 cellules/ml.

5.10 Effectuer un test de viabilité comme suit.

5.10.1 Verser une goutte de bleu trypan et une goutte de suspension cellulaire dans un tube propre et bien mélanger.

5.10.2 Incuber le mélange à température ambiante pendant 15 minutes.

5.10.3 Examiner la viabilité des cellules à l'aide d'un hemacytomètre. Les cellules viables possèdent une membrane cellulaire intacte et apparaissent lisses. Elles sont capable de rejeter le bleu de Trypan et sont de ce fait incolores. Les cellules non viables ont une membrane cellulaire altérée et n'apparaissent pas lisses. Elles ne sont pas capables de rejeter le bleu de Trypan et sont de ce fait colorées.

6 Les suspensions de lymphocytes sont prêtes à être utilisé pour un test de microlymphocytotoxicité de classe I par la méthode d'exclusion de colorant. Séparation des cellules B et des cellules T :

6.1 Technique de la colonne de nylon :

Les lymphocytes B et T sont facilement séparés en utilisant la technique de la colonne de nylon. Les cellules B et les macrophages adhèrent à la colonne de nylon alors que ce n'est pas le cas pour les cellules T. Se reporter à la 4e édition du Manuel de laboratoire de ASHI ; section 1.A.6 « Séparation des lymphocytes T et B sur colonne de nylon » pour la procédure de séparation des cellules B et T.

6.2 Procédure à l'aide de microbilles :

6.2.1 Les billes magnétiques peuvent être obtenues auprès de Invitrogen™.

6.2.2 La préparation des cellules HLA de classe Iet la préparation des cellules HLA de classe II(Invitrogen™) ont été testées afin de pouvoir être utilisées avec toutes les plaques d'antisérum de Classes I et II. Se reporter au mode d'emploi du fabricant.

6.2.3 En général, les cellules B et T purifiées par billes magnétiques sont prémarquées au CFDA (diacétate de carboxyfluorescéine) ou au bromure d'éthidium.

7 Test de microlymphocytotoxicité :

7.1 Préparer une suspension lymphocytaire ayant une viabilité d'au moins 80 % sans contamination excessive des cellules non lymphocytaires.

7.2 Retirer les plaques de typage HLA Invitrogen™ du congélateur, les décongeler et les amener à température ambiante pour des essais immédiats. Remettre les autres plaques congelés dans un congélateur qui produit du givre à – 55 °C ou en dessous.

7.2.1 Des sachets de plaques ouverts doivent être utilisés immédiatement ou peuvent être conservés pendant un mois à – 55 °C ou en dessous.

7.3 À l'aide d'une seringue de 50 µl, ajouter 1 µl de suspension lymphocytaire (environ 3 000 lymphocytes) sur le dessus de chaque puits de test, en prenant soin de ne pas toucher les antisérums. Examiner chaque puits pour s'assurer que la suspension lymphocytaire et l'antisérum sont mélangés.

7.4 Incuber les plaques à température ambiante (22 °C ± 3 °C).

Classe I (exclusion du colorant)	30 min
Classe I (fluorescence)	30 min
Classe II (fluorescence)	45 min

7.5 À l'aide d'une seringue de 250 µl, ajouter 5 µl du complément de lapin fourni avec les plaques dans les puits de test, en prenant soin de ne pas laisser les embouts de la seringue toucher le mélange antisérums/lymphocytes.

Remarque : les plaques de typage ont été optimisées avec le complémentfourni avec la trousse. L'utilisation de compléments différents risque d'entraîner des réactions faibles ou des faux positifs.

7.6 Incuber les plaques à température ambiante (22 °C ± 3 °C).

Classe I (exclusion du colorant)	60 min
Classe I (fluorescence)	50 min
Classe II (fluorescence)	60 min

7.7 À l'aide d'une seringue de 100 µl ou son équivalent, ajouter 2 µl d'éosine Y aqueuse filtrée à 5 % dans chaque puits de test et incuber à température ambiante (22 °C ± 3 °C) pendant 3 à 5 minutes. Ne pas laisser les embouts de la seringue toucher le mélange antisérums/lymphocytes. Passer cette étape si une analyse à base de fluorescéine est utilisée.

7.8 À l'aide d'une seringue de 250 µl, ajouter 5 µl de formol neutralisé filtré à chaque puits de test en prenant soin de ne pas toucher le mélange antisérums/lymphocytes. Passer cette étape dans les analyses à base de fluorescéine.

7.8.1 Analyses à base de fluorescéine : ajouter 5 µl d'iodure de propidium dans une solution de refroidissement dans chaque puits de test en prenant soin de ne pas toucher le mélange antisérums/lymphocytes.

7.9 Placer une lame protectrice sur le plateau et laisser les plaques reposer à température ambiante pendant 15 minutes pour permettre aux lymphocytes de sédimenter.

7.9.1 Les plaques colorées à l'éosine Y peuvent être lues au bout d'une heure ou le lendemain.

7.9.2 Les plaques colorées à la fluorescéine peuvent être lues au bout de 30 minutes ou le lendemain.

Remarque : la lecture d'une plaque colorée à la fluorescéine après 36 heures risque d'entraîner plus de faux positifs.

7.10 Lire le test à l'aide d'un microscope, amplifié 150 x avec éclairage par contraste de phase.

8 Résultats :

8.1 Les cellules mortes (celles qui possèdent l'antigène) absorbent le colorant, apparaissent dilatées et foncées et présentent des détails nucléaires nets. Les cellules viables (celles qui n'ont pas d'antigène) excluent le colorant, paraissent plus claires et plus petites que les cellules mortes.

8.2 D'autre part, les cellules viables marquées avec des pigments fluorescents sont vertes et les cellules non viables sont rouges.

8.3 Après une correction pour le pourcentage de cellules mortes dans des puits d'essai négatifs, le test est analysé comme suit :

% de cellules mortes	Score	Interprétation
0 à 10	1	Négatif
11 à 20	2	Négatif douteux
21 à 50	4	Positif faible
51 à 80	6	Positif
81 à 100	8	Positif fort
--	0	Illisible

9 Normes de performance :

9.1 Spécificité et sensibilité

9.1.1 Les plaques de typage HLA Invitrogen™ ont fait l'objet de tests approfondis par un dépistage interne et externe sur un panel lymphocytaire qualifié composé de divers groupes ethniques. Les dilutions et la spécificité de chaque sérum de typage HLA Invitrogen™ du sachet de plaques ont été déterminées par titrage (à l'aide de dilutions en série) pour des suspensions lymphocytaires ayant des types HLA connus. Chaque sérum est utilisé à sa dilution optimale pour obtenir la valeur de réaction la plus élevée tout en gardant sa spécificité. La grande majorité des sérums ont des valeurs de

réaction de 0,8 ou plus. Les informations données dans le certificat d'analyse fourni pour chaque lot de plaque aideront à expliquer les réactions inattendues.

9.1.2 Le sérum témoin HLA positif Invitrogen™ (sérum lymphocytaire antihumain cunicole) est contenu dans chaque plaque.

9.1.3 Le sérum humain en lot (PHS) Invitrogen™ est utilisé comme sérum témoin négatif sur chaque plaque. Ce sérum a été testé par des analyses microlymphocytotoxiques standard et celles-ci ne présentent pas d'anticorps lymphocytotoxiques aux cellules T et B.

10 Dépannage :

10.1 Un bruit de fond élevé ou des faux positifs peuvent être attribués aux causes suivantes :

10.1.1 L'échantillon présente une faible viabilité des cellules ou quelques cellules endommagées. Retirer les cellules mortes avant de les ajouter aux plaques de typage, ou préparer une autre suspension cellulaire.

10.1.2 L'échantillon est contaminé par des granulocytes ou d'autres cellules non lymphocytaires. Retirer les cellules non lymphocytaires avant de les ajouter aux plaques ou préparer une autre suspension cellulaire.

10.1.3 Des réactifs qui contiennent des substances toxiques ou dont le pH est hors de la plage physiologique normale peuvent être la cause de cellules endommagées. Vérifier que les réactifs utilisés ont été testés de façon appropriée.

10.1.4 Le complément est trop fort ou a un niveau de toxicité élevé. Utiliser le lot de complément fourni avec la trousse. .

10.1.5 Le temps d'incubation est trop long. Suivre de près ce mode d'emploi pour les temps d'incubation calculés en fonction des techniques d'isolation des cellules.

10.1.6 Une réaction incomplète ou des faux positifs peuvent être le résultat d'un transfert de cellules ou de sérum.

10.2 Une réaction faible ou des faux négatifs peuvent être attribués à :

10.2.1 L'échantillon est trop concentré. Vérifier que la concentration des cellules correspond à 2 à 3 x 10^6 cellules/ml.

10.2.2 L'échantillon est contaminé par des plaquettes.

10.2.3 Le pH des réactifs a changé suite à une exposition au CO_2 ou à une contamination bactérienne. Utiliser des réactifs frais et vérifier le pH avant de les utiliser.

10.2.4 Le complément était trop faible ou inactivé avant d'être ajouté aux plaques. Utiliser le lot de complément fourni avec la trousse.

10.2.5 La température d'incubation est incorrecte. Des températures trop basses risquent de causer une réaction plus lente, alors que des températures trop élevées risquent d'entraîner une dégradation des composants thermolabiles. S'assurer que la température d'incubation est de 22 °C ± 3 °C.

10.2.6 Le temps d'incubation est trop court. Suivre de près ce mode d'emploi pour les temps d'incubation calculés en fonction des techniques d'isolation des cellules.

11 Limitations et avertissements :

11.1 Le complément de lapin est un réactif essentiel au déroulement du test de lymphocytotoxicité et peut varier d'un lot à l'autre. Un complément insatisfaisant entraînera de fausses réactions négatives ou des réactions faibles ou encore un bruit de fond élevé dans le contrôle négatif. L'activité du complément d lapin peut être déterminée en effectuant des tests avec des contrôles positifs et négatifs appropriés ainsi qu'avec des lymphocytes et des antisérums connus.

11.2 Invitrogen Corporation recommande l'usage de lot complément spécifique a fourni avec la trousse.

11.3 La qualité des compléments HLA-ABC et DR Invitrogen™ a été contrôlée afin que ces derniers répondent individuellement aux titrages minimums et à la toxicité de l'arrière-plan (voir le catalogue et/ou l'encart dans le paquet du complément). Toutefois, il est conseillé de tester les échantillons de chaque nouveau lot de complément en parallèle à un lot existant ou connu. Un complément de lapin approprié doit présenter une lecture de puissance de 8 pour le contrôle positif et la majorité des réactions positives. Il doit y avoir une lecture de puissance de 1 pour le contrôle négatif et la majorité des puits négatifs.

11.4 Éviter toute exposition au CO_2 car elle pourrait entraîner des changements de pH qui risquent d'être anticomplémentaires.

11.5 Une réactivité croisée existe dans le système HLA et risque d'entraîner certaines fausses réactions positives. Certains antisérums dans le plateau de typage HLA manifestent une vaste spécificité (supertypique). Ces antisérums sont définis sur la fiche de travail.

11.6 Les tests HLA qui utilisent les plaques de typage HLA Invitrogen™ doivent être effectués en présence d'un directeur, d'un superviseur technique et/ou d'un superviseur général qualifié conformément aux normes de laboratoires acceptées. Nous insistons sur le fait que ces produits sont réservés aux professionnels.

11.7 Les échantillons doivent être conservés à température ambiante jusqu'à l'emploi et l'EDTA ne doit pas être utilisé comme anticoagulant pour les échantillons prélevés.

11.8 Tous les résultats de typage doivent être confirmés par une méthode de typage alternative.

PR006
Révision 05
Imprimé 8/08

European Representative:

Invitrogen Ltd.
11 Bassendale Road
Croft Business Park
Bromborough, Wirral
CH62 3QL, U.K.
Tel: 44 151 346 1234





Invitrogen Corporation
9099 North Deerbrook Trail
Brown Deer, Wisconsin 53223 USA
Tel: (800) 955-6288
Fax: (800) 331-2286
www.invitrogen.com

Produits Auto Déclarés (marques CE)	
149986	HLA C Locus Plaques de Typage